GEFÖRDERT VOM

Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Veröffentlichung der Ergebnisse von Forschungsvorhaben im BMBF-Programm

B I O L O G I E

"Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 0313711A gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegen bei den Autoren".

Forschungsvorhaben:
Verbundprojekt: GABI-KANADA (CGAT): Reduzierung des Gehalts an Fusarium - Toxinen in Weizen mit einem genomischen Ansatz / Teilprojekt A

Förderkennzeichen: 0313711A
Laufzeit: 01.04.2006 bis 31.03.2010

Zuwendungsempfänger:
Technische Universität München, 80290 München

Schlussbericht

GABI-KANADA (CGAT): Reduzierung des Gehalts an Fusarium-Toxinen in Weizen mit einem genomischen Ansatz/ Teilprojekt A

Ausführende Stellen:
Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung
Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
Technische Universität München (TUM)
Emil-Ramann-Str. 4, D-85354 Freising

Projektleiter: Dr. Michael Schmolke

Abt. Cytogenetik und Genomanalyse
Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK)
Corrensstraße 3, D-06466 Gatersleben

Projektleiter: Dr. Patrick Schweizer

I. Kurze Darstellung

1. Aufgabenstellung

An der Technischen Universität München wurden drei Teilprojekte bearbeitet:

Teilprojekt A beschäftigte sich mit der Assoziationskartierung von Fusariumresistenz-QTL in einem Sortiment aus adaptiertem europäischen Winterweizensorten basierend auf Kopplungsungleichgewichten (Linkage Disequilibrium, LD) innerhalb dieses Sortiments. Dieses Teilprojekt ist dem Modul 1 zugeordnet.
Ziel dieses Teilprojekts war Charakterisierung genomischer Regionen des Weizens, die zuvor über biparentale Kartierungspopulationen identifiziert wurden. In diesem Teilprojekt sollte gezeigt werden, ob über einen LD-Ansatz dieselben QTL und/oder neue QTL-Regionen identifiziert werden können. Zudem sollte mittels dieser Analysen die genetische Diversität innerhalb des europäischen Winterweizengenpools untersucht werden.

Im Rahmen von Teilprojekt B wurde eine mutagenisierte Population mittels EMS-Behandlung (Ethylmethansulfonat) basierend auf der deutschen Winterweizensorte Dream erstellt. Diese Population wurde im weiteren Verlauf des Projekts für TILLING-Analysen (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) verwendet. Zunächst wurde die Frequenz der induzierten Mutationen innerhalb der mutagenisierten Population mittels locusspezifischen Primerpaaren analysiert. Der Aufbau dieser TILLING-Population ist ebenfalls dem Modul 1 zugeordnet.

Das Teilprojekt C wurde als Unterauftrag der Technischen Universität München vom Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) durchgeführt. Das Teilprojekt C wurde im Modul 3 „Functional Genomics“ durchgeführt. Ziel dieses Projektteils war die Identifikation von Kandidatengenen, deren Regulation mit Fusariumresistenz vermittelt durch *quantitative trait loci* (QTL) auf dem Chromosom 3BS und 5A assoziiert ist, plus die funktionelle Analyse der identifizierten Gene mittels *virus-induced gene silencing* (VIGS) durch *barley-stripe mosaic virus* (BSMV).
Basierend auf Ergebnissen der Projektpartner IPK (Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung) und ECORC (Eastern Cereal and Oilseed Research Centre, Ottawa) sollten schließlich mit TILLING-Population auch Kandidatengene für Fusariumresistenz untersucht werden (Modul 3: Functional Genomics).

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Sowohl in Deutschland als auch in Kanada können Ährenfusarien bei Weizen (*Triticum aestivum* L.) zu beträchtlichen Ertrags- und Qualitätsverlusten führen. Insbesondere die Kontamination der Körner mit pilzlichen Toxinen bereitet große Probleme. Die Entwicklung und der Anbau von resistenten Sorten werden in beiden Ländern als die beste Methode zur Verminderung des Fusariumbefalls und damit zur Reduktion von Toxinen im Erntegut betrachtet. Dabei soll der gezielte Einsatz von molekulargenetische Methoden in der Züchtung dazu dienen, die genetische Verbesserung des Weizens zu beschleunigen. Die Ergebnisse dieses Projekts leisten somit einen Beitrag zu einer nachhaltigen landwirtschaftlichen Produktion.

Im Rahmen von GABI-Kanada wurden Forschungsaktivitäten auf deutscher und kanadischer Seite aufeinander abgestimmt, um die Thematik Fusariumresistenz umfassend zu bearbeiten. Von dieser Zusammenarbeit wurden synergistische Effekte durch die Verwendung komplementären genetischen Material erwartet. Zudem lagen die Schwerpunkte der Forschung auf deutscher Seite eher im Bereich der molekulargenetischen Charakterisierung interessanter genomischer Regionen, während auf kanadischer Seite die Transkriptom- und Proteom-Analysen stärker betont wurden. Die deutschen Forschungsarbeiten waren wiederum in drei verschiedene Module unterteilt:

Modul 1) Molekulargenetische Charakterisierung von europäischen Resistenzquellen

Modul 2) Introgression von exotischen Resistenzen in europäisches Elitematerial

Modul 3) Functional Genomics

Insgesamt war das Verbundprojekt so konzipiert, dass die umfangreiche Expertise von Projektpartnern aus akademischen Forschungseinrichtungen und der Industrie genutzt wird. Die jeweiligen Partner verfügen über die spezielle Kompetenz und Erfahrung, die zur Durchführung der entsprechenden Projektaufgaben notwendig waren. Die unmittelbare Übertragung der Forschungserkenntnisse für die praktische Anwendung wurde durch die Einbindung der Wirtschaftspartner in allen Projektphasen garantiert.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Für das Teilprojekt A (Assoziationsstudien) war sowohl die genotypische Charakterisierung des Winterweizensortiments mit molekularen Markern als auch die phänotypische Evaluierung des Fusariumbefalls der Sorten in Feldversuchen notwendig. Die Zusammenstellung und Saatgutvermehrung des Sortiments wurde bereits vor Beginn der Förderungsdauer (01.04.2006) eingeleitet. Die in Tabelle 1a aufgeführten Arbeiten entsprechen der Planung aus dem Projektantrag

Tabelle 1a: Übersicht der Arbeiten in Teilprojekt A (Assoziationsstudien)

Tätigkeiten	**Partner**	**Jahr**
Zusammenstellung und Saatgutvermehrung des Winterweizen-Sortiments (200 Sorten)	TUM[1]	2005/06
Feldprüfungen der Sorten (4 Orte)	TUM, SU-Bio[2]	2006-2008
Genotypisierung der Sorten mit molekularen Markern	TUM, SU-Bio, LfL[3]	2006-2008
Analyse von Kopplungsungleichgewichten innerhalb des Sortiments	TUM	2008
Assoziationsstudien	TUM	2009

[1]Technische Universität München; [2]Saaten-Union Biotech GmbH; [3]Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft

Ergänzend wurde 2007/08 der deutsch-kanadische Sommerweizenversuch (siehe Bericht Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft) zum Vergleich des Zuchtmaterials im Hinblick auf die Fusariumresistenz am Versuchstandort der Technischen Universität München in Roggenstein betreut und bonitiert.

Für das Teilprojekt B (TILLING) haben sich gegenüber der geplanten Milestones aus dem Projektantrag einige Änderungen ergeben. Vorversuche zur Erstellung der TILLING-Population wurden bereits 2004 durchgeführt. Hierfür wurde Saatgut der Winterweizensorte Dream mit verschiedenen EMS-Konzentrationen (40mM – 200mM) zur Induktion von Mutationen behandelt. Basierend auf Keimtests mit dem behandelten Saatgut wurde ebenfalls 2004 damit begonnen zwei mutagenisierte Subpopulationen (40mM, 60mM) aufzubauen. Im Projektverlauf hat sich herausgestellt, dass die gewählten EMS-Konzentrationen nicht zu einer ausreichenden Mutationsfrequenz geführt haben. Daher wurde 2008 damit begonnen eine zweite TILLING-Population zu erstellen (70mM EMS). Zudem musste die ursprüngliche Zielsetzung der Erstellung von 10.000 Linien reduziert werden. Die in Tabelle 1b dargestellten Arbeiten entsprechen also nicht in allen Punkten der ursprünglichen Planung aus dem Projektantrag.

Tabelle 1b: Übersicht der Arbeiten in Teilprojekt B (TILLING)

Tätigkeiten	Partner	Jahr
Aufbau der TILLING-Population bis zur M_2-Generation (1. Ansatz, 2500 Pflanzen)	TUM[1]	2005-2007
Bestimmung der Mutationsfrequenz	TUM	2007
Weiterführung und Phänotypisierung interessanter M_2-Pflanzen	TUM	2007-2009
Keimtests nach Behandlung mit unterschiedlichen EMS-Konzentrationen und Behandlungsdauer	TUM	2008
Aufbau der TILLING-Population bis zur M_2-Generation (2. Ansatz, 1500 Pflanzen)	TUM	2008-2009
Bestimmung der Mutationsfrequenz	TUM	2010
Untersuchung von Kandidatengenen für Fusariumresistenz	TUM	2010

[1]Technische Universität München

Für das Teilprojekt C (Functional Genomics) haben sich gegenüber der geplanten Milestones aus dem Projektantrag einige Änderungen ergeben. Einer von drei Infektionsversuchen im Gewächshaus für die Transkriptprofilierung musste infolge ungenügender Vernalisation der Pflanzen wiederholt werden, was eine Verzögerung von rund 3 Monaten zur Folge hatte. Ferner nahm die Projektmitarbeiterin während 9 Monaten (2008/2009) Mutterschutz/Elternzeit in Anspruch, was zu einer weiteren Verzögerung von 9 Monaten führte. Aus diesen Gründen konnten die Transkriptomdaten erst Ende 2009 hinreichend vollständig ausgewertet werden, um Kandidatengene für VIGS zu nominieren. Während der letzten 3 Monate des Projektes (kostenneutrale Verlängerung bis 31.3.2010) wurden diese kloniert und die rekombinanten BSMV Stämme hergestellt. Eine Testung konnte aber innerhalb der kostenneutralen Verlängerung nicht mehr durchgeführt werden. Stattdessen wurde (erfolglos) versucht ein neues kosteneffizienteres VIGS System zu etablieren, welches auf biolistischem Bombardement von Keimlingen mit pflanzlichen Expressionskassetten, welche die drei viralen Genome enthalten, basiert. Extrakte der so infizierten Spenderpflanzen sollte anschließend für die VIGS Experimente verwendet werden.

Tabelle 1c: Übersicht der Arbeiten in Teilprojekt 3 (Functional Genomics)

Tätigkeiten	Partner	Jahr
Entwicklung und Optimierung des VIGS Systems in adulten Weizenpflanzen	IPK[1]	2007-2008
Expressionsprofilierung während resistenter und anfälliger Weizen-FHB Interaktionen	IPK, ECORC[2]	2007-2010
VIGS von Kandidatengenen, die mittels Expressionsprofilierung gefunden wurden	IPK	2010
Re-sequenzierung mittels VIGS validierter Kandidatengene in Weizenakzessionen (Assoziatonskartierung)	TUM[3]	2010

[1]Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung; [2]Cereal and Oilseed Research Centre in Ottawa; [3]Technische Universität München;

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Teilprojekt A (Assoziationsstudien)

Die meisten Untersuchungen zur Kartierung von Fusariumresistenzloci (QTL, quantitative trait loci) wurden mit resistenten Sommerweizen aus Asien oder Südamerika durchgeführt (Bürstmayr et al. 2009). Allerdings beeinflusst die Introgression von solch exotischen Resistenzen in adaptiertes europäisches Elitematerial wichtige agronomische Eigenschaften möglicherweise negativ (linkage drag; siehe auch Berichte zu Modul 2). Seit einiger Zeit gibt es auch Studien, die sich mit der Kartierung von Resistenz-QTL mit moderaten Effekten im europäischen Winterweizen beschäftigen (z.B. Schmolke et al. 2005).

Für QTL-Kartierungen werden üblicherweise biparentale Populationen verwendet, die basierend auf einer Kreuzung zwischen Eltern entwickelt wurden, die sich bezüglich des Zielmerkmals unterschieden (siehe Modul 1; Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft). Eine alternative Methode zur Identifizierung von Resistenzloci stellen Assoziationsstudien basierend auf der Bestimmung von Kopplungsungleichgewichten (LD, linkage disequilibrium) zwischen Markerallelen dar. Für derartige Assoziationsstudien wird ein genetisch diverses Sortiment an Genotypen herangezogen, bei dem eine große Anzahl an (historischen) Rekombinationen stattgefunden hat. Für die Verwendung dieser Methode müssen also keine speziellen Kartierungspopulationen erstellt werden. Weiterhin wird erwartet, dass über LD-Kartierungen eine präzisere Lokalisierung von Resistenzloci im Genom erreicht werden kann (insbesondere bei Fremdbefruchtern). Assoziationsstudien wurden zum Zeitpunkt der Projektbeantragung bereits bei einer Reihe von Pflanzenarten erfolgreich durchgeführt: z.B. mit Weidelgras (Skøt et al. 2005), Kartoffel (Gebhardt et al. 2004) und Gerste (Kraakman et al. 2004). Zum Zeitpunkt als der Projektantrag gestellt wurde gab es keine Veröffentlichungen über Assoziationskartierungen im hexaploiden Weizen.

Teilprojekt B (TILLING)

TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) ist in erster Linie eine Methode der Reversen Genetik mit dem Ziel Kandidatengene funktionell zu charakterisieren (McCallum et al. 2000). Für diese Untersuchungen wird eine Population erstellt, in der über Saatgutbehandlungen mit Ethylmethansulfonat (EMS) zufällig im Genom verteilte Punktmutationen induziert werden. Da die M_1-Pflanzen für die induzierten Mutationen chimär sind, werden ein oder zwei Körner jeder M_1-Pflanze in die M_2-Generation überführt. Die Detektion von Pflanzen mit Punktmutationen in einem Kandidatengen erfolgt über die PCR-Amplifizierung der Zielsequenz aus DNA-Pools von vier bis acht M_2-Pflanzen. Anschließend wird die Bildung von Heteroduplexmolekülen zwischen mutierter und Wildtyp-DNA provoziert und diese mit Endonukleasen verdaut. Über die nachfolgende Polyacrylamid-gelelektrophorese können geschnittene PCR-Fragmente und somit Punktmutationen detektiert werden. Die phänotypischen Effekte von Mutationsallelen werden in der M_3- und folgenden Generationen der entsprechenden M_2-Pflanzen untersucht (Colbert et al. 2001). Für eine effiziente Nutzung der TILLING-Methode ist die Mutationsfrequenz innerhalb der Population entscheidend. Bei einer geringen Mutationsfrequenz sinken die Chancen, dass Mutationen in einem Zielgen induziert wurden bzw. es wird ein sehr große Population benötigt. Bei einer sehr hohen Mutationsfrequenz steigt das Risiko von letalen Defekten und der Entstehung von sterilen Pflanzen. Bereits vor der Antragstellung wurden diesbezüglich Vorversuche bei der TUM durchgeführt und mit dem Aufbau einer mutagenisierten Population begonnen (siehe 3. Planung und Ablauf des Vorhabens). Bezug genommen wurde bei diesen Vorversuchen auch auf Ergebnisse, die bereits bei Gerste veröffentlicht wurden (Caldwell et al. 2004). Zum Zeitpunkt der Antragstellung wurden zudem Ergebnisse zum TILLING bei hexaploidem Sommerweizen veröffentlicht (Slade et al. 2005). Hier wurden EMS-Konzentrationen von 0,75%, 1,0% und 1,2% (entspricht ca. 60mM, 80mM und 100mM) für die Saatgutbehandlung eingesetzt und eine Mutationsfrequenz von 1/24kb erzielt. Basierend auf den Ergebnissen von Slade et al. (2005) wurde daher für die im Rahmen des GABI-Kanada-Projekts zu entwickelnden Population bei EMS-Behandlungen mit 40mM und 60mM (~ 0,5% und 0,75%) eine Mutationsfrequenz von 1/50kb bis 1/60kb erwartet.

Teilprojekt C (Functional Genomics)

Im Vorfeld des Projekts wurden bei KWS-Lochow GmbH eine BC3 Rückkreuzungpopulation im Winterweizen „Opus“ entwickelt, die homozygot für die beiden R-Locus Introgressionen aus „Sumai 3“ aus Chromosom 3BS und 5A sind. Aus dieser Population wurden 40 Linien ausgewählt, die homozygot sind für beide Introgressionen (Tabelle 2). Dies ermöglichte eine Poolingstrategie der jeweiligen QTL-Genotypen für die Transkriptomprofilierung mit dem

erwarteten Ergebnis einer Homogenisierung von Hintergrundeffekten durch restliche Donorgenomfragmente.

Tabelle 2: Verwendete Rückkreuzungslinien.

Genotyp	Linien	Genotyp	Linien
bbaa	10	bbAA	6
bbaa	117	bbAA	11
bbaa	120	bbAA	33
bbaa	150	bbAA	54
bbaa	193	bbAA	103
bbaa	200	bbAA	133
bbaa	203	bbAA	151
bbaa	247	bbAA	241
bbaa	287	bbAA	244
bbaa	482	bbAA	295
BBAA,	25	BBaa	7
BBAA,	27	BBaa	12
BBAA,	132	BBaa	121
BBAA,	240	BBaa	223
BBAA,	245	BBaa	282
BBAA,	252	BBaa	329
BBAA,	289	BBaa	366
BBAA,	328	BBaa	408
BBAA,	335	BBaa	432
BBAA,	340	BBaa	437

Als Inokulum wurde das Isolat *Fusarium culmorum* FC46 von T. Miedaner (Universität Hohenheim) verwendet, welches als hochgradig virulent beschrieben wurde.

Die Transkriptprofilierungsarbeiten am IPK fanden unter Verwendung eines in-Haus gespotteten 13K cDNA Array der Gerste statt. Dies hatte den Vorteil einer erheblichen Kostenreduktion, allerdings mussten identifizierte Kandidatengene anschließend mittels RT-qPCR validiert werden, da die (Kreuz)hybridisierungssignale der Weizen cDNA mit dem Gerstenarray erwartungsgemäß nicht immer genspezifisch waren sondern nahe verwandte paraloge Sequenzen miterfasste. Zum Zeitpunkt des Projektstarts war eine Reihe von Transkriptprofilierungsstudien veröffentlicht, die aber alle nur die allgemeine Antwort in Weizen oder Gerste auf Fusariumbefall darstellten und keine Informationen zu Markertranskripten der resistenten oder anfälligen Interaktion beinhalteten. Aus diesem Grund wurde im Teilprojekt des IPK eine stringente Analyse des Weizentranskriptoms während suszeptiblen und resistenten Interaktionen innerhalb eines homogenen genetischen Hintergrundes durchgeführt. Zum Zeitpunkt des Projektstarts waren außer einer mündlichen Kommunikation von Steven Scofield (Purdue University) keine Daten zur Machbarkeit von virus-induced gene silencing (VIGS) durch barley-stripe mosaic virus (BSMV) in Ähren von adulten Weizenpflanzen bekannt.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Im Modul 1 von GABI-Kanada arbeiteten insbesondere die Kooperationspartner Technische Universität München, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft und Saaten-Union Biotec GmbH zusammen. Der Fokus der Zusammenarbeit lag hier insbesondere bei der Durchführung von Feldversuchen und der Genotypisierung des Assoziationssortiments mit SSR-Markern (Saaten-Union Biotec GmbH) bzw. AFLP-Markern (Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft). Eine Kooperation mit kanadischen Kollegen vom Cereal Research Institute in Winnipeg (CRC) erfolgte in erster Linie über den Austausch von (unveröffentlichten) Informationen über genetische Karten, die physikalische Lokalisierung von Markern im Weizengenom und hinsichtlich der Auswertung von Assoziationen.

Im Zusammenhang mit Teilprojekt B (Modul 1), dem Aufbau der TILLING-Population, erfolgte ein intensiver Informationsaustausch mit dem GABI-TILL-Konsortium (Teilnahme an Workshops in Gatersleben 2006, 2007 und 2009 bzw. an Projekttreffen des Konsortium in Kiel 2007, Gatersleben 2008 und Freising 2009).

Hinsichtlich der Teilprojekte B und C (Modul 3) erfolgte die Zusammenarbeit mit dem Eastern Cereal and Oilseed Research Centre in Ottawa (ECORC). Das ECORC hat die Sorte Dream, den Donor der TILLING-Population, in die Expressionsanalysen mittels Affymetrix-Gene-Chips eingebunden und basierend auf den Ergebnissen dieser Transkriptomanalysen der Technischen Universität München Sequenzinformationen zu Kandidatengenen für Fusariumresistenz zur Verfügung gestellt. Das Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung hat die signifikant während der resistenten Interaktion mit *Fusarium culmorum* regulierten Gene mittels des Web Comparator tools zu probe sets des Affymetrix Chips für Weizen zugeordnet und die Daten an ECORC übermittelt. Ein TILLING Ansatz dieser Gene wurde aus Zeitgründen, infolge Verzögerungen sowohl bei der Erstellung der TILLING Population an der TUM als auch bei der abschließenden Transkriptomanalyse, nicht mehr durchgeführt.

Zwischen den Verbundpartnern gab es jährliche Projekttreffen alternierend in Deutschland (Gatersleben und Freising) und Kanada (Winnipeg und Ottawa). Sie dienten zu Kooperationsabsprachen und -entscheidungen, sowie dem Erfahrungs- und Datenaustausch.

II. Eingehende Darstellung

1. Verwendung der Zuwendung und der erzielten Ergebnisse

Teilprojekt A (Assoziationskartierung)

Bei der Technischen Universität München waren zu Beginn des Projekts die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Durchführung dieses Teilprojekts gegeben. Sowohl die Laborausstattung als auch die Kapazitäten für die Feldversuche am Standort Roggenstein entsprachen den Anforderungen für die geplanten Arbeiten. Bereits vor Projektbeginn wurde das Sortiment von 200 europäischen Sorten zusammengestellt. Das entsprechende Saatgut stammt von europäischen Getreidezüchtern bzw. von der Genbank in Gatersleben und wurde in der Saison 2005/06 für die geplanten Feldversuche vermehrt. Die Feldversuche zur Evaluierung des Fusariumbefalls, sowie der Wuchshöhe und den Zeitpunkt des Ährenschiebens wurden wie geplant mit zwei Wiederholungen an vier Orten (Roggenstein, Herzogenaurach, Leutewitz, Eckendorf) in den Jahren 2006/07 und 2007/08 durchgeführt. Die Merkmale Fusariumbefall, Wuchshöhe und Zeitpunkt des Ährenschiebens zeigten für die Mittelwerte über alle Versuche erwartungsgemäß eine quantitative Variation. Die Varianzanalyse ergab für alle drei Merkmale signifikante Effekte der Sorten, der Umwelten sowie der Interaktion zwischen Sorten und Umwelten. Es wurden folgende Heritabilitäten ermittelt: Fusariumbefall = 0,84; Wuchshöhe = 0,94; Zeitpunkt des Ährenschiebens= 0,88. Zwischen dem Fusariumbefall und der Wuchshöhe wurde eine signifikante negative Korrelation festgestellt (r=-068; P>0,01).

Die Extraktion der genomischen DNA für die Markeranalysen wurde im Juni 2006 abgeschlossen und Aliquots der DNA an den Projektpartner Saaten-Union Biotec GmbH versand. Bis Ende 2008 wurde das Weizensortiment an der Technischen Universität München mit insgesamt 127 SSR-Primerpaaren (Simple Sequence Repeats) genotypisiert. Die Daten von weiteren 113 SSR-Markern wurden vom Kooperationspartner Saaten-Union Biotec GmbH zur Verfügung gestellt. Einige der SSR-Primer waren nicht locusspezifisch, daher mussten diverse Markerloci über die Verwendung von Nullitetrasomenlinien den Chromsomen des Weizens zugeordnet werden. Die SSR-Marker hatten im Durchschnitt 4 Allele je Locus, wobei seltene Allele mit einer Frequenz <5% nicht berücksichtigt wurden.
In Zusammenarbeit mit der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft wurden die Sorten zudem mit 132 AFLP-Markern (Amplified Fragment Lenght Polymorphism) genotypisiert. Ende 2006 erschien eine Veröffentlichung zur Nutzung einer neuen Markertechnologie (DArT: Diversity Array Technology) bei Weizen (Akbari et al. 2006). Um eine bessere

Genomabdeckung mit Markern zu gewährleisten, wurde beschlossen, das Sortiment zusätzlich mit der DArT-Technik zu genotypisieren (540 Marker). Nach einer Qualitätskontrolle wurden schließlich 217 SSR-, 120 AFLP- und 393 DArT-Marker für die finale Auswertung verwendet.

Eine Zusammenfassung der eingesetzten Marker, sowie die Ergebnisse zu den paarweisen Markervergleichen zur Bestimmung des LD sind in den Tabellen 3a und 3b dargestellt.

Tabelle 3a: Marker zur Genotypisierung des Winterweizen-Sortiments

Chrom.	A-Genom			B-Genom			D-Genom		
	SSR	DArT	AFLP	SSR	DArT	AFLP	SSR	DArT	AFLP
1	8	21	2	18	20	6	6	19	6
2	6	24	9	12	25	10	11	9	3
3	12	21	3	16	28	12	7	2	5
4	6	24	3	8	11	5	10	4	1
5	18	9	4	12	33	10	7	7	3
6	6	30	11	11	32	11	10	3	2
7	6	30	6	20	27	8	7	14	-
Σ	**62**	**159**	**38**	**97**	**176**	**62**	**58**	**58**	**20**

Tabelle 3b: Paarweise Markeranalysen zur Bestimmung des LD im Winterweizen-Sortiment.

Chrom.	A-Genom			B-Genom			D-Genom		
	P<0,01	R^2 Ø	R^2 >0,3	P<0,01	R^2 Ø	R^2 >0,3	P<0,01	R^2 Ø	R^2 >0,3
1	107	0,05	14	176	0,04	32	86	0,07	26
2	182	0,08	64	226	0,05	39	47	0,04	6
3	92	0,04	11	234	0,03	26	7	0,02	1
4	87	0,07	26	63	0,04	6	20	0,04	2
5	85	0,03	6	176	0,04	30	25	0,04	3
6	116	0,04	30	221	0,06	71	12	0,01	0
7	77	0,05	21	195	0,03	25	47	0,07	14

P<0,01: Anzahl der Markerloci mit signifikantem LD
R^2 Ø: Durchschnittliches R^2 für alle Marker eines Chromosoms
R^2 >0,3: Anzahl der Markerloci eines Chromosoms mit R^2 >0,3

Für die Bestimmung der Populationsstruktur innerhalb des Weizensortiments wurden 42 SSR-Marker ausgewählt, die sich nicht im LD mit anderen Markern befinden. Die Analyse mit diesen 42 Markern ergab zwei Subpopulationen innerhalb des Winterweizen-Sortiments (Abbildung 1). Eine Subpopulation besteht aus britischen Sorten bzw. Genotypen, bei denen britische Sorten im Stammbaum auftreten (UK-Subpopulation).

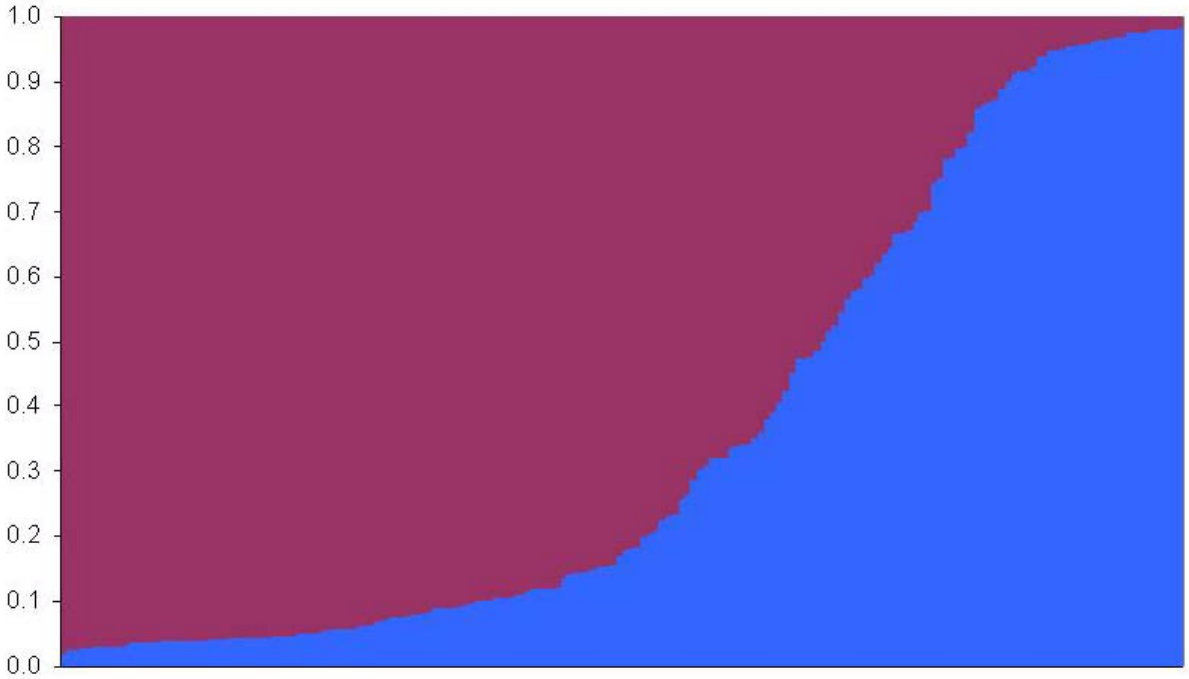

Abbildung 1: Balkendiagramm zur Darstellung der Populationsstruktur innerhalb des Winterweizen-Sortiments; x-Achse: Sorten geordnet nach Subpopulationen (Q-Werte); y-Achse: Koeffizient für die Zugehörigkeit der Genotypen zu einer Subpopulation; rote Balken= Subpopulation 1 (Europa); blaue Balken= UK-Subpopulation

Die Populationsstruktur wurde als Co-Faktor in die Regressionsanalysen zur Ermittlung von Marker-Merkmal-Assoziationen mit einbezogen. Insgesamt konnten für das Merkmal Fusariumbefall signifikante Assoziationen mit 120 Markern festegestellt werden ($P<0,05$; Abb. 2). Abgesehen von den Markern auf Chromosom 1BS, 3DL und 7B lag bei den oben genannten Markern auch eine Assoziation mit dem Merkmal Wuchshöhe vor.

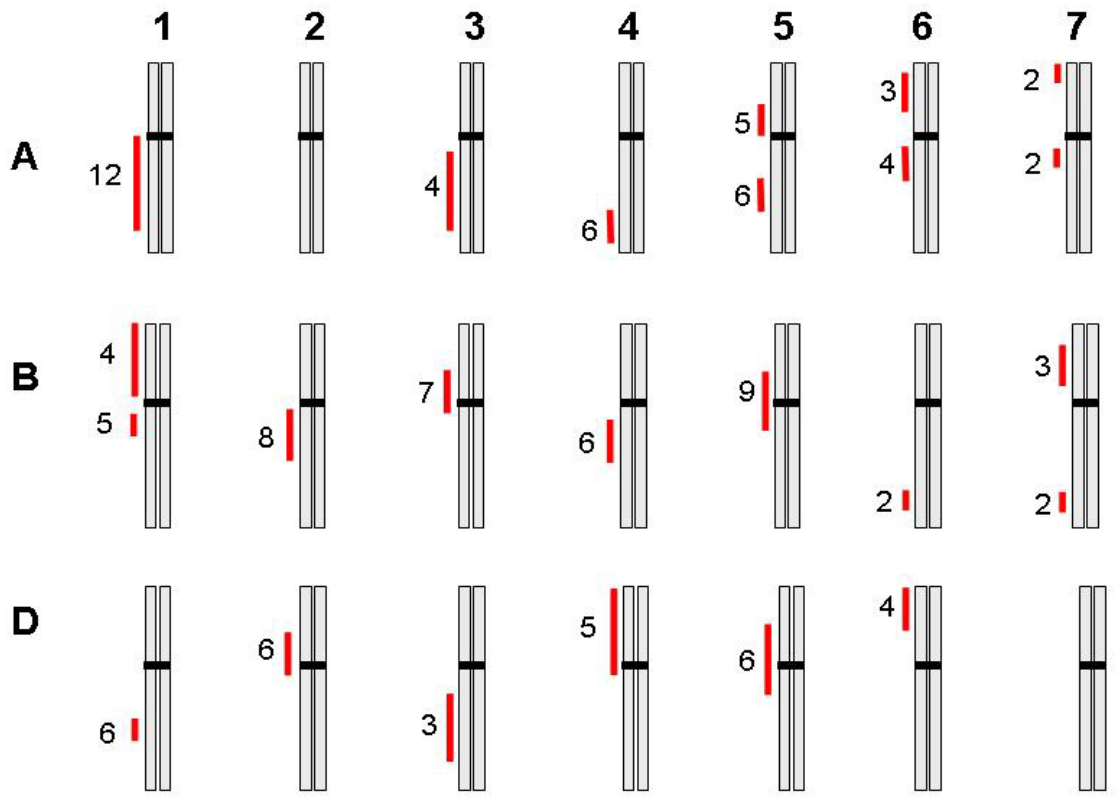

Abbildung 2: Ergebnisse der Assoziationsstudien für das Merkmal Fusariumbefall. Die roten Balken kennzeichnen die genomischen Regionen, die mit dem Fusariumbefall assoziiert sind. Die entsprechende Anzahl der Marker ist neben den Balken angegeben.

Über die im Teilprojekt A durchführten Assoziationsstudien mittels LD-Kartierung konnten 24 genomische Regionen, die im Zusammenhang mit der Ausprägung der Fusariumresistenz stehen, identifiziert werden. Neunzehn dieser genomischen Regionen wurden im Winterweizen bereits nach Verwendung verschiedener biparentaler Kartierungspopulationen beschrieben (3AL, 4AL, 5AS, 5AL, 6AL, 7AL, 1BS, 1BL, 2BL, 3B-C, 4BL, 5B-C, 6BL, 7BS, 7BL, 2D, 3DL, 4DS, 6DS, Gervais et al. 2003, Paillard et al. 2004, Schmolke et al. 2005, 2008, Draeger et al.2007, Klahr et al. 2007, Semagn et al. 2007, Holzapfel et al. 2008). Für die Chromosomen 1AL, 6AS, 7AS, 1DL und 5D-C wurden im Winterweizen zuvor keine Assoziationen mit der Fusariumresistenz nachgewiesen. Diese Ergebnisse zeigen, dass trotz der relativ eingeschränkten genetischen Diversität des verwendeten Winterweizensortiments, die LD-Kartierung von agronomischen Merkmalen eine effiziente Alternative zur biparentalen Kartierung von QTL darstellt. Die Erwartung, dass über die LD-Kartierung QTL präziser lokalisiert werden können als über biparentale Kartierungsansätze, konnte hier allerdings nicht bestätigt werden. Diese Tatsache ist wahrscheinlich auf die eben erwähnte eingeschränkte genetischen Diversität des Sortiments zurückzuführen.

Teilprojekt B (TILLING)

Der Aufbau der mutagenisierten Population der Sorte Dream wurde bereits vor Projektbeginn eingeleitet (siehe auch I.3. und I.4.). Dream ist eine fusariumresistente Winterweizenssorte, die bereits in einer biparentalen Kartierungspopulation zur Identifizierung von Resistenz-QTL genutzt wurde (Schmolke et al. 2005). Die einzelnen Arbeitsschritte zur Entwicklung der Population sind im Folgenden stichpunktartig aufgeführt.

Entwicklung der ersten beiden Subpopulationen (40mM und 60mM):

- Frühjahr 2004: Keimtests nach EMS-Behandlung der Körner
- Herbst 2004: Anzucht der M_1-Generation im Gewächshaus (6.000 Pflanzen)
- Frühjahr 2005 Auspflanzen der M_1-Pflanzen in das Freiland
- Sommer 2005: Ernte der Körner von fertilen M_1-Pflanzen (5.600 Pflanzen)
- Herbst 2005: Aussaat von 10.000 M_2-Körnern im Freiland
- Sommer 2006: Ernte der Körner von fertilen M_2-Pflanzen (2.500 Pflanzen)
- Herbst 2006–Herbst 2009: Weiterführung einer Teilpopulation in die nächsten Generationen im Freiland (1000 M_3-Linien; 400 M_4-Linien; 150 M_5-Linien)
- Herbst 2007: DNA-Extraktion der fertilen M_2-Pflanzen abgeschlossen
- Ende 2007: vorläufige Bestimmung der Mutationsfrequenz (Tabelle 4)

Tabelle 4: Identifizierung von Punktmutationen in locusspezifischen Amplicons.

Gen	Amplikon-größe[1]	M_2-Pflanzen	
		2106 (40 mM)	362 (60 mM)
Vrn-B1	627bp	–	2 SNPs
Vrn-D1	644bp	–	–
Glu-A3	1001bp	–	–
Glu-B3	520bp	–	–
Glu-D1d	378bp	–	–
Waxy-A1	635bp	nu[2]	–
Waxy-B1	582bp	nu	2 SNPs
Waxy-D1	445bp	nu	–
Mutationsfrequenz		---	1/438kb

[1]Werte gegenüber den Zwischenberichten um 100bp korrigiert
[2]nicht untersucht;

Für die Heteroduplexanalysen zur Identifizierung von Sequenzvariationen in Kandidatengenen wurde ein Li-Cor DNA-Analyzer 4300 über Projektmittel finanziert. Die Korrektur der Amplikongrößen um -100bp wurde nach Empfehlung des GABI-TILL-Konsortiums vorgenommen. Bei Verwendung eines Li-Cor DNA-Analyzers 4300 nach dem Restriktionsverdau der Heteroduplexmoleküle können nur Fragmente die größer als 100 Basenpaare sind zuverlässig detektiert werden. Eine Mutationsfrequenz von 1/438kb wurde für einen effizienten Einsatz der TILLING-Methode als zu gering eingestuft (bzw. die vorhandene Population ist zu klein).

Basierend auf diesen vorläufigen Ergebnissen wurde damit begonnen eine weitere TILLING-Subpopulation aufzubauen, die auf 70mM EMS-Behandlungen basiert. Da sich herausstellte, dass ein großer Teil der mutagenisierten Pflanzen im Freiland nicht überlebt, wurde der Aufbau dieser TILLING-Subpopulation in Gewächshäusern durchgeführt. Durch die Ansucht der Pflanzen im Gewächshaus sind allerdings zusätzliche Kosten angefallen (siehe Erfolgskontrollbericht). Die Arbeitsschritte zur Entwicklung dieser dritten Subpopulation sind im Folgenden wieder stichpunktartig aufgeführt.

- Anfang 2008: erneute Keimtests nach EMS-Behandlung der Körner
- Frühjahr 2008: Anzucht der M_1-Generation im Gewächshaus (14.000 Pflanzen)
- Frühjahr 2009: Anzucht der M_2-Generation im Gewächs (2500 Pflanzen)
- Ende 2009: Ernte der Körner von fertilen M_2-Pflanzen (1500 Pflanzen)
- Anfang 2010: DNA-Extraktion der fertilen M_2-Pflanzen abgeschlossen
- März 2010: vorläufige Bestimmung der Mutationsfrequenz (Tabelle 5)

Tabelle 5: Identifizierung von Punktmutationen in locusspezifischen Amplicons.

Gen	**Amplikon-größe**	**M_2-Pflanzen**		
		2106 (40 mM)	**362 (60 mM)**	**1521 (70 mM)**
Vrn-B1	627bp	–	2 SNPs	nu
Vrn-D1	644bp			nu
Gsp-D1	305bp	nu[1]	1 SNP	nu
Glu-A3	1001bp	–	–	nu
Glu-B3	520bp	–	–	nu
Glu-D1d	378bp	–	–	nu
Waxy-A1	635bp	nu	2 SNPs	nu
Waxy-B1	582bp	nu	–	nu
Waxy-D1	445bp	nu	–	nu
FHB-EST[2]	588bp	5 SNPs	3 SNPs	15 SNPS
Mutationsfrequenz		1/1587kb	1/235kb	1/60kb

[1]nicht untersucht;
[2]Kandidatensequenz für Fusariumresistenz (ECORC)

Die neuerlichen Keimtestversuche mit der Sorte Dream haben gezeigt, dass EMS-Behandlungen auch unter nahezu identischen Bedingungen nicht zu reproduzierbaren Effekten führen. Keimtestversuche mit einer weiteren Winterweizen-Sorte (Hermann) haben zudem gezeigt, dass die Wirkung der EMS-Behandlung vom Genotyp abhängig ist.

Die geringen Mutationsfrequenzen in den Subpopulationen 1 (40mM EMS) und 2 (60mM EMS entsprechen nicht Erwartungen. Es wird vermutet, dass dies im Zusammenhang mit Anzucht dieser Subpopulationen im Freiland steht. Ein großer Anteil der mutagenisierten Pflanzen, hat unter Freilandbedingungen nicht überlebt und wahrscheinlich waren insbesondere die Pflanzen mit hoher Mutationsfrequenz betroffen. Dennoch wurde ein Teil der Subpopulation 1 als Ramsch in Freilandversuchen bis zur M_5-Generation weitergeführt. Ausgewählt wurden hierfür M_2-Pflanzen, bei denen im Vergleich zur Donorsorte Dream z.B. eine verzögerte Phänologie oder eine veränderte Wuchshöhe beobachtet wurden. Diese Versuche wurden durchgeführt, um zu testen, ab welcher Generation Unterschiede bei quantitativen Merkmalen wieder zuverlässig erfasst werden können. Die Versuche haben ergeben, dass Unterschiede bei Merkmalen wie Wuchshöhe und Fusariumbefall zwischen den muatgenisierten Linien frühestens ab der M_4-, besser noch ab der M_5-Generation evaluiert werden sollten.

Die Mutationsfrequenz von 1/60kb in Subpopulation 3 (70mM EMS) kann als geeignet für eine effiziente Durchführung von TILLING-Untersuchungen betrachtet werden. In den beiden bisher erschienen Publikationen zum TILLING bei Sommerweizen liegt die Mutationsfrequenz mit 1/24kb bzw. 1/38 (Slade et al. 2005, Uauy et al. 2009) allerdings noch höher. Ein Grund hierfür ist vermutlich eine höhere Mortalitätsrate bei der Vernalisation der Winterweizen-Pflanzen.

Für die Identifizierung von Kandidatengenen für Fusariumresistenz (Modul 3: Functional Genomics) wurde Ende 2007 Saatgut der Sorte Dream an den Kooperationspartner Eastern Cereal and Oilseed Research Centre in Ottawa (ECORC) abgegeben. Das ECORC hat die Sorte Dream in Expressionsanalysen mittels Affymetrix-Gene-Chips eingebunden. Basierend auf diesen Untersuchungen wurden der Technischen Universität München vom ECORC Ende 2009 12 EST-basierte Kandidatensequenzen für Fusariumresistenz zur Verfügung gestellt. In der verbleibenden Projektlaufzeit ist es gelungen für zwei dieser EST-Sequenzen locusspezífische Primer zu etablieren. Mit einem dieser Kandidatengene wurden alle drei TILLING-Subpopulationen auf induzierte Mutationen gescreent (Tab. 5). Weitere Untersuchungen zur Bestätigung dieser Mutationen (z.B. Analyse der entsprechenden M_3-Nachkommen; Rückkartierung in die Dream/Lynx-Population bzw. Untersuchung des Assoziationssortiments) konnten in der Projektkaufzeit nicht mehr durchgeführt werden.

Teilprojekt C (Functional Genomics; IPK)

Transkriptprofilierung:

Es wurden drei *Fusarium* Inokulationskampagnen in einem klimatisierten Gewächshaus mit täglicher Punkt-Inokulation einzelner Ähren zum Zeitpukt der Blüte durchgeführt: Zwei im Frühling und eine im Spätherbst. Alle drei biologischen Replikate des Inokulationsversuchs wurden erfolgreich abgeschlossen. Aus allen Replikaten wurde RNA extrahiert und erfolgreich an den barleyPCRC2 13K cDNA Array hybrisidiert. Die bioinformatische Analyse der Transkriptprofilierungsexperimente mittels der EDGE Software, welche anhand diskreter Signalintensitätswerte p- und q-Werte für Signifikanz und false discovery rate berechnet, ergab 1811 pathogenregulierte Gene mit $p<0.05$ und $q<0.05$. Davon waren 816 Transkripte um einen Faktor 2 oder mehr reguliert. Eine robuste, nicht-parametrische rank product (RP) Analyse durchgeführt in der Arbeitsgruppe von Dr. M. Strickert am IPK ergab 2163 pathogenregulierte Gene mit einer false discovery rate von $FDR<0.05$ und 15 differenziell regulierte Gene zwischen den phänotypisch am unterschiedlichsten Genotypen (3b5a versus 3B5A). Diese niedrige Anzahl genotypspezifischer Regulaitonsmuster deutet auf eine hohe Ähnlichkeit der transkriptionellen Antwort der jeweiligen Linienpools auf Fusariuminokulation hin. Dieses Verhalten ist am Beispiel der Pools „3B5A res.“ und „3b5a susc“ dargestellt (Abb. 3).

Eine zweite EDGE-basierte Analyse der 1811 Gene, deren Transkriptprofile durch die Fusariuminokulation beeinflusst waren, wurde durchgeführt mit dem Ziel weitere Gene zu finden, deren Expression nicht nur durch Fusariumbefall sondern auch durch An- oder Abwesenheit der beiden Resistenz QTL beeinflusst wird. Dies führte zur Identifizierung von 23 Kandidaten ($p<0,05$; $q<0,1$). Insgesamt wurden mittels RP und EDGE also 38 Gene des Weizens identifiziert, deren Expression sich statistisch signifikant zwischen den Genotypen 3B5A und 3b5a unterscheidet. Aus diesen Kandidaten sollte eine Kurzliste für VIGS Experimente in der verbleibenden Projektlaufzeit erstellt werden. Wie unten dargestellt konnte aus Zeitgründen aber keine Prüfung der Kandidatengene mehr durchgeführt werden.

Einer der herausragenden, statistisch signifikanten Kandidaten für die resistente Interaktion ist in Abbildung 4 dargestellt. Es handelt sich um ein 2-Nitropropan-dioxygenaseähnliches Protein noch unbekannter Funktion in der Weizen/Fusarium Interaktion. Interessanterweise ist das homolge Gen in der Gerste nicht nur durch Fusariumbefall sondern auch die exogene Applikation des DON Toxins induzierbar (http://www.plexdb.org/).

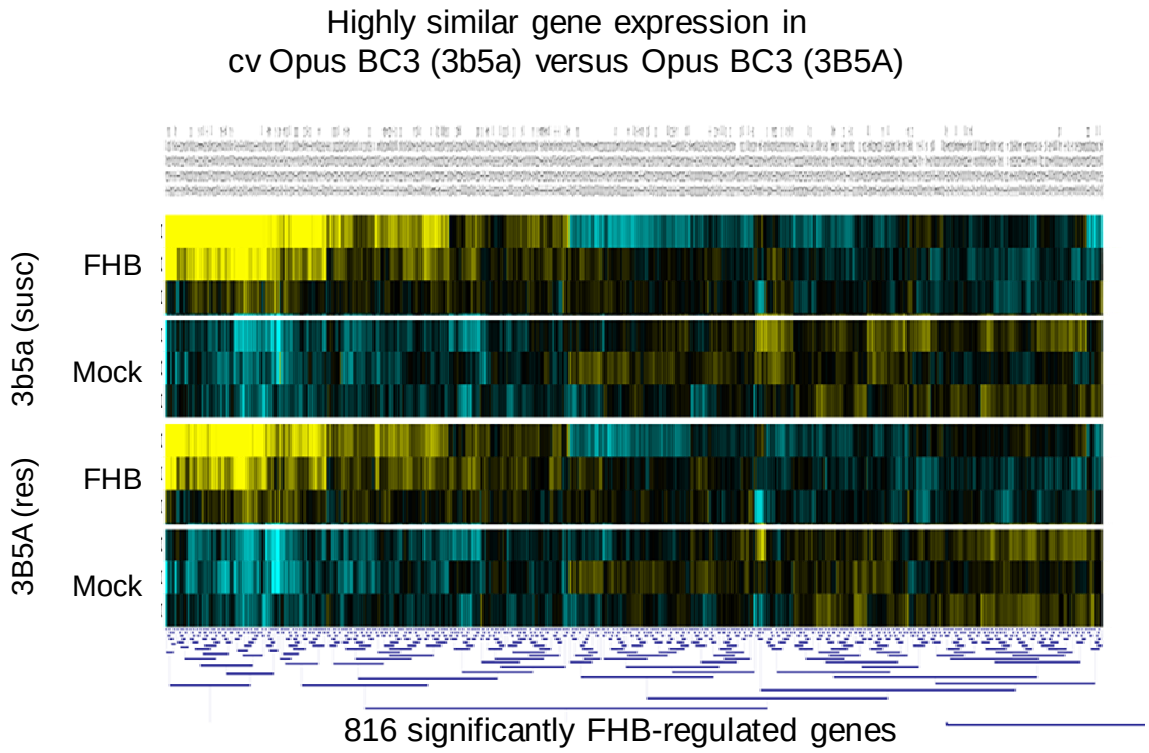

Abbildung 3: Ähnliche Transkriptprofile resistenter und anfälliger Linienpools nach *Fusarium culmorum* Inokulation. Pro Behandlung und Liniepool sind jeweils 3 Zeitpunkte (24h, 48, und 72h; von unten nach oben) dargestellt. Gelb: Hohe Transkriptabundanz; Blau: Niedrige Transkriptabundanz.

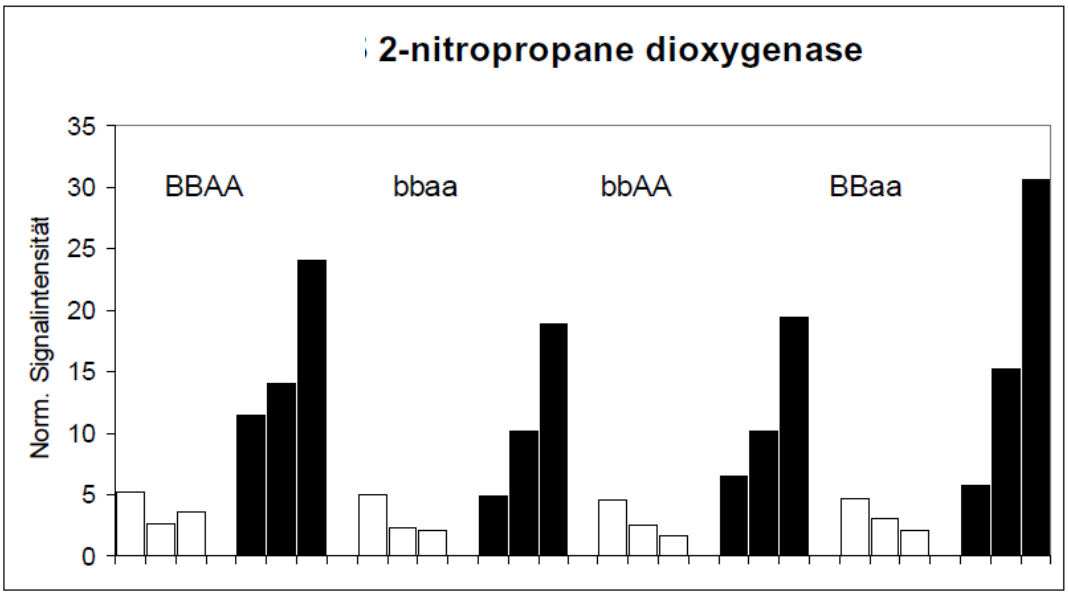

Abbildung 4: Transkriptprofile eines fusariuminduzierten Kandidatengenes mit erhöhter Transkriptabundanz in resistenten Linienpools „BBAA“ und „BBaa“.

Die Auswertung der Transkriptprofilierung ist noch nicht abgeschlossen und wird in Kooperation mit Bioinformatikern im Hause weiter vorangetrieben. Dies soll einerseits zu einer Übersicht der transkriptionellen Antwort in Weizenähren bei Fusariumbefall führen, andererseits aber auch die Liste der resistenz- oder anfälligkeitskorrelierten Kandidatengene weiter eingrenzen, um diese im Anschluss an das Projekt funktionell testen zu können.

Virus-induced gene silencing (VIGS):

Ein VIGS System in adulten Weizenpflanzen der extrem früh blühenden und zwergwüchsigen Sorte „Apogee“ wurde entwickelt (Abb. 5).

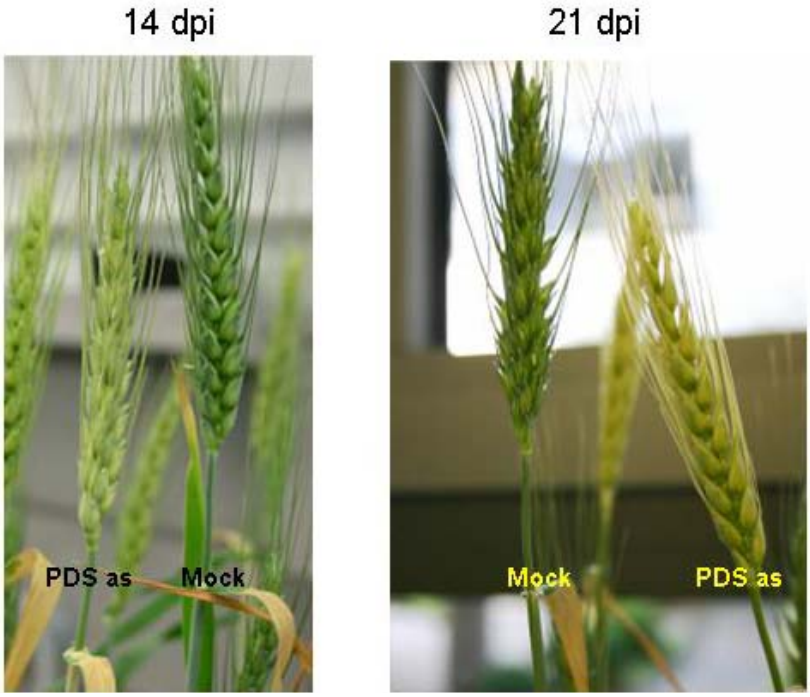

Abbildung 5: BSMV-induziertes photobleaching in Ähren von „Apogee“ Weizen durch ein PDS antisense Konstrukt. Das Virus wurde auf dem Fahnenblatt appliziert.

Es wurde unter Anderem versucht, die auf *in vitro* Transkription basierende Inokulationsmethode durch eine schnellere und kostengünstigere, auf Bombardement mit pflanzlichen Expressionsplasmiden (enthaltend das virale Genom) beruhende Methode umzustellen. Saft von Blättern mit BSMV Symptomen sollten als Inokulum für die eigentlichen Versuche dienen. Da die Effizienz der Virusinfektion aber immer geringer war als mit dem direkten Einreiben viraler in vitro Transkripte, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt. Statt dessen wurden Bedingungen für robuste VIGS Symptome in Ähren nach mechanischer Inokulation des Fahnenblattes mit in vitro Transkripten gesucht. Zum Endes des Projektes konnten regelmässig virale Transkripte in Ähren infizierter Pflanzen nachgewiesen werden. Allerdings konnte keine Testung der identifizierten Kandidatengene mehr durchgeführt werden.

2. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Für das Teilprojekt A (Assoziationsstudien) waren die umfangreichen Markeranalysen des Winterweizensortiments als auch die phänotypische Evaluierung des Fusariumbefalls der Sorten in Feldversuchen notwendig. Die Genotypisierung der Sorten mit DArT-Markern war ursprünglich nicht vorgesehen, wurde aber nach Erscheinen der entsprechenden Veröffentlichung zur Nutzung dieser neuen Markertechnologie bei Weizen (Akbari et al. 2006) als angemessen angesehen und haben einen wichtigen Beitrag zur Beantwortung der Versuchsfragen geleistet.

Für das Teilprojekt B (TILLING) war eine große Anzahl DNA-Extraktionen von mutagenisierten M_2-Pflanzen notwendig. Zudem mussten für die Untersuchung von induzierten Mutationen umfangreiche PCR-Reaktionen und Polyacrylamidgelektrophoresen durchgeführt werden. Zur Durchführung dieser Heteroduplexanalysen war es notwendig über Projektmittel ein Li-Cor DNA-Analyzer 4300 zu finanzieren. Für die Etablierung von locusspezifischen PCR-Reaktionen beim hexaploiden Weizen wurde zudem eine Vielzahl von Amplikons kloniert und sequenziert. Der Aufbau einer dritten TILLING-Subpopulation in Gewächshäusern war im Projektantrag nicht vorgesehen. Diese Arbeiten wurden nach der Bestimmung der Mutationsfrequenz der ersten beiden Subpopulationen aber als absolut notwendig betrachtet.

Die an der Technischen Universität München bearbeiteten Teilprojekte waren mit hohem Arbeitsaufwand verbunden, der nur durch die Einstellung eines Technischen Assistenten sowie einer Wissenschaftlerin über Projektmittel zu bewältigen war. Die geleisteten Arbeiten waren notwendig und angemessen.

Die im Rahmen des Teilprojekts C (Functional Genomics) am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung durchgeführte Transkriptprofilierung zur Identifizierung von Kandidatengenen für Fusariumresistenz, sowie die Arbeiten zur Etablierung der VIGS-Technik bei Weizen waren notwendig und angemessen.

4. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Zu Projektbeginn war nicht bekannt, ob die Methode der LD-Kartierung (Teilprojekt A, Assoziationsstudien) im Genpool des europäischen Winterweizens aufgrund der zu erwartenden eingeschränkten genetischen Diversität erfolgreich durchgeführt werden können. Die Ergebnisse für dieses Teilprojekt haben gezeigt, dass die meisten der zuvor bekannten Fusariumresistenz-QTL auch über den LD-Ansatz identifiziert werden konnten. Verglichen mit biparentalen Kartierungspopulationen ist es für den LD-Ansatz nicht notwendig spezielle Kartierungspopulationen zu erstellen. Mithilfe eines geeigneten Sortiments können Fusariumresistenz-QTL also vergleichsweise effizient identifiziert werden. Diese Erkenntnisse können auch für die Identifizierung weiterer quantitativer Merkmale wie

Septoria-tritici-Resistenz, Ertrags- und Qualitätseigenschaften im Winterweizen genutzt werden. In diesem Teilprojekt identifizierte Marker, die mit Fusariumresistenz assoziiert sind, können zudem für die marker-gestützte Selektion in der Züchtung eingesetzt werden.
Die Ergebnisse zu Teilprojekt B (TILLING) haben gezeigt, dass diese Methode der Reversen Genetik auch im hexaploiden Winterweizen etabliert werden kann. Es hat sich aber gezeigt, dass die notwendige Vernalisation bei den mutagenisierten Pflanzen eine erhöhte Mortalitätsrate verursacht. Verglichen mit Sommerweizen sollten also etwas reduzierte EMS-Konzentrationen eingesetzt werden. Die im Rahmen dieses Teilprojekts generierte dritte Subpopulation (70mM) ist nach den bisherigen Ergebnissen zur Untersuchung von Kandidatengenen geeignet und stellt eine neue genetische Ressource für weitere Forschungsprojekte dar.
Die Ergebnisse des Teilprojekts C (Functional Genomics) am IPK können folgendermaßen weiterverwendet werden: 1) Wissenschaftliche Publikation der transkriptionellen Antwort von beinahe isogenen Linienpools, die sich in der An- oder Abwesenheit von 2 wichtigen Resistenz QTL gegen F*usarium graminearum/culmorum* unterscheiden. 2) Identifikation einer kurzen Liste an Kandidatengenen, deren Expression entweder mit Anfälligkeit oder Resistenz korreliert, für weiterführende funktionelle Analysen (VIGS, TILLING, transgene Pflanzen). 3) Etablierung eines VIGS Systems in der Sorte Apogee, um Kandidatengene zu testen.

5. Bekannt gewordene Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Im Bereich der QTL-Kartierung bei Winterweizen sind insbesondere folgende Publikationen interessant: Draeger et al. (2007), Klahr et al. (2007), Semagn et al. (2007), Holzapfel et al. (2008), Schmolke et al. (2008), Löffler et al. (2009). Zu Assoziationsstudien bei Weizen sind folgende Publikationen in der Projektlaufzeit erschienen: Breseghello & Sorrels (2006), Chao et al. (2007), Crossa et al. (2007), Somers et al. (2007), Tommasini et al. (2007). Auf diese Veröffentlichungen wurde im Rahmen des Teilprojekts A (Assoziationsstudien) über die Auswahl der SSR-Marker für die Genotypisierung und bei der statistischen Auswertung der Daten reagiert: Zudem ist eine Veröffentlichung zur Nutzung der neuen Markertechnologie bei Weizen (DArTs) erschienen (Akbari et al. 2006). Aufgrund dieser Veröffentlichung wurde entschieden für die Assoziationsstudien ebenfalls DArT-Marker einzusetzen. Bezüglich der Etablierung der TILLING-Technik bei Weizen ist eine Publikation während der Projektlaufzeit erschienen: Uauy et al. 2009. Da diese Publikation aber erst zum Ende der Projektlaufzeit erschienen ist, hatte sie keinen Einfluss mehr auf den Verlauf dieses Projekts.

6. Erfolgte und geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

Bisher wurden noch keine Ergebnisse in peer-reviewed- Zeitschriften veröffentlicht. Eine Publikation zu den Assoziationsstudien Anfang 2011 eingereicht werden. Zudem ist geplant die Ergebnisse der Transkriptionsanalysen zu veröffentlichen. Für eine Veröffentlichung zum TILLING bei Weizen sind noch weitergehende Untersuchungen notwendig (Drittmittelprojekt beantragt).

Anhang: Zitierte Literatur

Akbari M, Wenzl P, Caig V, Carling J, Xia L, Yang S, Uszynski G, Mohler V, Lehmensiek A, Kuchel H, Hayden MJ, Howes N, Sharp P, Vaughan P, Rathmell B, Huttner E, Kilian A (2006) Diversity arrays technology (DArT) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome. Theoretical and Applied Genetics 113:1409–1420

Breseghello F, Sorrells E (2006) Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. Genetics 172: 1165–1177

Bürstmayr H, Ban T, Anderson J (2009) QTL mapping and marker-assisted selection for Fusarium head blight resistance in wheat: a review. Plant Breeding 128, 1—26

Caldwell DG, McCallum N, Shaw P, Muehlbauer GJ, Marshall DF, Waugh R (2004) A structured mutant population for forward and reverse genetics in barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Journal 40: 143–150

Chao Shiaoman, Zhang W, Dubcovsky J, Sorrells M (2007) Evaluation of genetic diversity and genome-wide linkage disequilibrium among U.S. wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm representing different market classes. Crop Science 47: 1018-1030

Colbert T, Till BJ, Tompa R, Reynolds S, Steine MN, Yeung AT, McCallum CM, Comai L, Henikoff S (2001) High-throughput screening for induced point mutations. Plant Physiology 126: 480-484

Crossa J, Burgueño J, Dreisigacker S, Vargas M, Herrera-Foessel SA, Lillemo M, Singh RP, Trethowan R, Warburton M, Franco J, Reynolds M, Crouch JH, Ortiz R (2007) Association analysis of historical bread wheat germplasm using additive genetic covariance of relatives and population structure. Genetics 177: 1889-1913

Draeger R, Gosman A, Steed,. Chandler M, Thomsett E, Srinivasachary, Schondelmaier J, Buerstmayr H, Lemmens M, Schmolke M, Mesterhazy A, Nicholson P (2007) Identification of QTLs for resistance to Fusarium head blight, DON accumulation and associated traits in the winter wheat variety Arina. Theoretical and Applied Genetics 115: 617–625

Gebhardt C, Ballvora A, Walkemeier B, Oberhagenmann P, Schüler K (2004) Assessing genetic potential in germplasm collections of crop plants by marker-trait association: a case study for potatoes with quantitative variation of resistance to late blight and maturity type. Molecular Breeding 13: 93-102

Gervais L, Dedryver F, Morlais JY, Bodusseau V, Negre S, Bilous M, Groos C, Trottet M (2003) Mapping of quantitative trait loci for field resistance to Fusarium head blight in an European winter wheat. Theoretical and Applied Genetics 106: 961–970

Holzapfel J, Voss HH, Miedaner T, Korzun V, Häberle J, Schweizer G, Mohler V, Zimmermann G, Hartl L (2008) Inheritance of resistance to Fusarium head blight in three European winter wheat populations. Theoretical and Applied Genetics 117: 1119-1128

Klahr A, Zimmermann G, Mohler V (2007) Effects of environment, disease progress, plant height and heading date on the detection of QTLs for resistance to Fusarium head blight in an European winter wheat cross. Euphytica 154: 17–28

Kraakman ATW, Niks RE, Van den Berg PMMM, Stam P, Van Eeuwijk FA (2004).Linkage disequilibrium mapping of yield and yield stability in modern spring barley cultivars. Genetics 168: 435-446

Löffler M, Schön CC, Miedaner T (2009) Revealing the genetic architecture of FHB resistance in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) by QTL meta-analysis. Molecular Breeding 23: 473–488.

McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S (2000) Targeted screening for induced mutations. Nature Biotechnology 18: 455-457

Paillard S, Schnurbusch T, Tiwari R, Messmer M, Winzeler M, Keller B, Schachermayr G (2004) QTL analysis of resistance to Fusarium head blight in Swiss winter wheat (*Triticum aestivum* L.). Theoretical and Applied Genetics 109: 323–332

Schmolke M, Zimmermann G, Buerstmayr H, Schweizer G, Miedaner T, Korzun V, Ebmeyer E, Hartl L (2005) Molecular mapping of Fusarium head blight resistance in the winter wheat population Dream/Lynx. Theoretical and Applied Genetics 111: 747–756

Schmolke M, Zimmermann G, Schweizer G, Miedaner T, Korzun V, Ebmeyer E, Hartl L (2008) Molecular mapping of quantitative trait loci for field resistance to Fusarium head blight in a European winter wheat population. Plant Breeding 127, 459—464

Semagn K, Skinnes H, Bjørnstad A, Guri Marøy A, Tarkegne Y (2007) Quantitative trait loci controlling Fusarium head blight resistance and low Deoxynivalenol content in hexaploid wheat population from ‘Arina’ and NK93604. Crop Science. 47: 294–303.

Skøt L, Humphreys MO, Armstead I, Heywood S, Skøt KP, Sanderson R, Thomas ID, Chorlton KH, Sackville NR (2005) An association approach to identify flowering time genes in natural populations of *Lolium perenne* (L.). Molecular Breeding 15: 233-245

Slade AJ, Fuerstenberg SI, Loeffler D, Steine MN, Facciotti D (2005) A reverse genetic, nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING. Nature Biotechnology 23: 75-81

Somers D, Banks T, DePauw R, Fox S, Clarke J, Pozniak C, McCartney C (2007) Genome-wide linkage disequilibrium analysis in bread wheat and durum wheat. Genome 50: 557-567

Tommasini L, Schnurbusch T, Fossati ED, Mascher F, Keller B (2007) Association mapping of Stagonospora nodorum blotch resistance in modern European winter wheat varieties. Theoretical and Applied Genetics 115: 697–708

Uauy C, Paradiso F, Colasuonno P, Tran RK, Tsai H, Berardi S, Comai L, Dubcovsky J (2009) A modified TILLING approach to detect induced mutations in tetraploid and hexaploid wheat. BMC Plant Biology 9: doi:10.1186/1471-2229-9-115